

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 February 2001 (21.02.01)	
International application No. PCT/EP00/04364	Applicant's or agent's file reference H 4156 PCT
International filing date (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	Priority date (day/month/year) 25 May 1999 (25.05.99)
Applicant WEGENER, Matthias et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 November 2000 (17.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Olivia TEFY
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

5

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H 4156 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/04364	International filing date (<i>day month year</i>) 16 May 2000 (16.05.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 25 May 1999 (25.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/00.		
Applicant COGNIS DEUTSCHLAND GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 November 2000 (17.11.00)	Date of completion of this report 25 June 2001 (25.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/04364

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-13 . as originally filed.
 pages _____ . filed with the demand.
 pages _____ . filed with the letter of _____
 pages _____ . filed with the letter of _____
- ☒ the claims. Nos. 1-10 . as originally filed,
 Nos. _____ . as amended under Article 19.
 Nos. _____ . filed with the demand.
 Nos. _____ . filed with the letter of _____
 Nos. _____ . filed with the letter of _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____ . as originally filed.
 sheets/fig _____ . filed with the demand.
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/04364

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following documents:

D1: US-A-5 372 943 (INLOW DUANE ET AL.),
13 December 1994 (1994-12-13)

D2: DE-A-197 35 790 (HENKEL KGAA), 25 February
1999 (1999-02-25).

1.2 Document D1 is considered the prior art closest to the subject matter of Claim 1 and discloses the use of microemulsions in fermentation methods applied to render lipids bioavailable (column 3, lines 5-24). That document also discloses the use of unsaturated fatty acids, mixtures of polyunsaturated fatty acids and, in particular, of fatty acid methyl esters, *inter alia*, in these micro-emulsions, contained for example in fish oil (Example 1).

1.3 Claims 1 and 2 do not meet the requirements of PCT Article 33(3) because the use of the claimed O/W emulsions has already been disclosed in D1. D1 discloses the use of lipids, *inter alia* also fatty acid methyl esters, which belong to the group of the fatty acid alkyl esters, in the form of



microemulsions, for use in cell culture media (see columns 3 and 4 of the description).

The difference between the invention as per Claims 1 and 2 and the closest prior art lies in the definition of droplet size. The technical problem can therefore be described to be that of devising an alternative method that uses microemulsions in fermentation methods in which droplet size is defined to range precisely from 1 to 100 nm.

Proceeding from the general prior art (e.g. D2, page 2, line 27), this droplet size is the normal droplet size used in microemulsion methods. Consequently, this technical feature cannot be used to substantiate inventive step.

Furthermore, considering the general prior art, the use of vegetable oils in said microemulsions can be regarded as obvious.

Claims 1 and 2 therefore do not meet the requirements of PCT Article 33(3).

- 1.4 The use of fatty acid methyl esters, as defined in Claim 6, or of further components, as defined in Claims 7-9, cannot be considered inventive either, firstly because the use of these specific compounds is obvious to a person skilled in the art from the general prior art and, in addition, no technical effect can be derived from these specific formulations of the microemulsions.
- 1.5 The restrictions defined in dependent Claims 3-5 and 10 with regard to droplet size and the specific



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/04364

weight ratios also fail to involve a technical effect and these claims therefore also fail to meet the requirements of PCT Article 33(3).



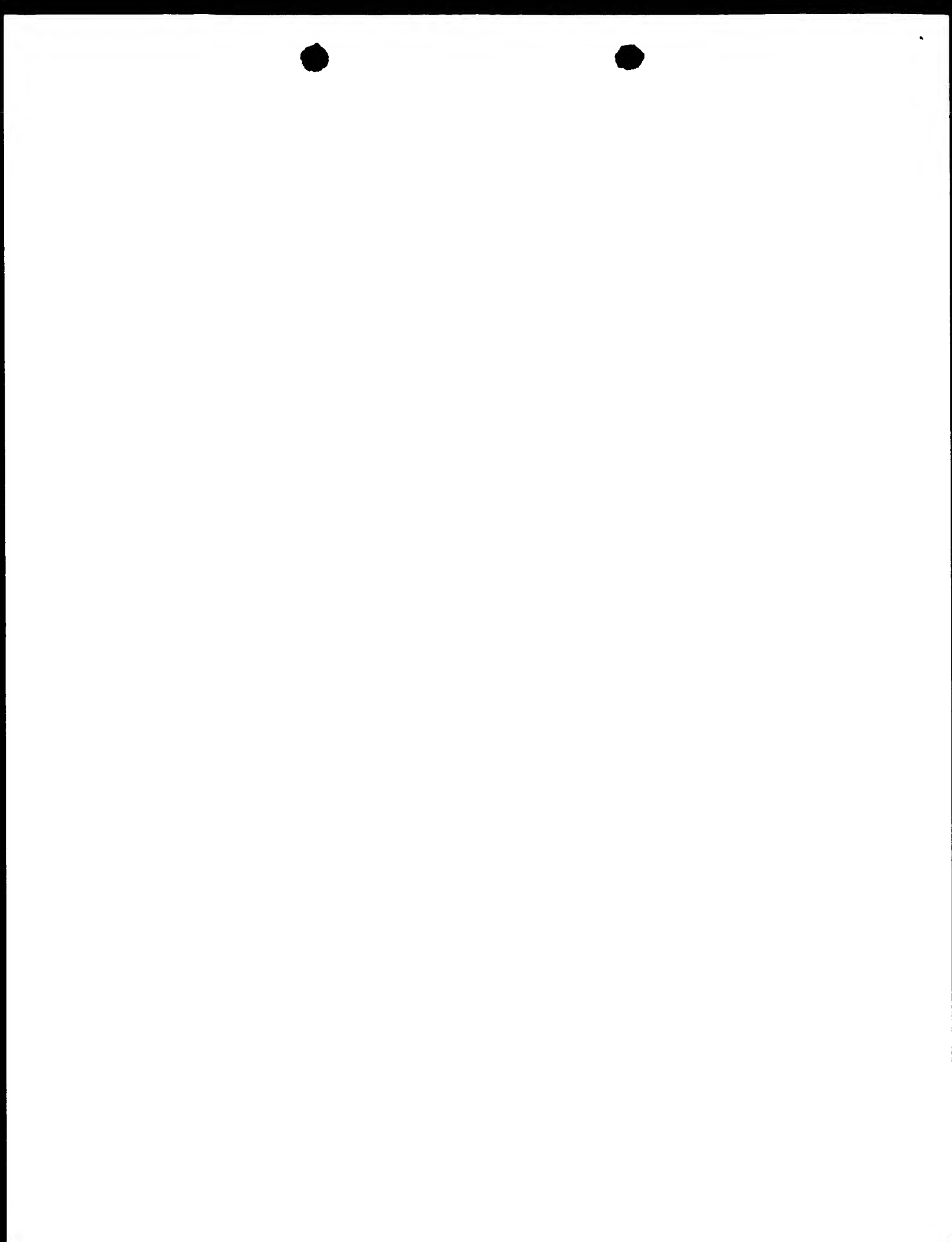
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/EP 00/04364

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The use of the expression "preferably" in Claims 3-5 and 10 leaves the reader uncertain about the meaning of the technical feature in question. As a result, the definition of the subject matter of these claims is unclear (PCT Article 6).



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/04364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/00 C12N1/26 C12P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 372 943 A (INLOW DUANE ET AL) 13 December 1994 (1994-12-13) column 3, line 5 - line 23 column 4, line 36 - line 50 column 8, line 21 - line 50 claims 1-13; examples 1-3; table 1 ---	1-8,10
X	US 5 674 830 A (BRENKMAN TANJA ET AL) 7 October 1997 (1997-10-07) column 2, line 10 - line 17 column 3, line 3 - line 18; claims 1-20; examples 1-6 ---	1-7,9,10
A	DE 197 35 790 A (HENKEL KGAA) 25 February 1999 (1999-02-25) page 1, column 26 - column 34 page 3, line 4 - line 7 claims 1-11; tables 1,2 ---	1-10
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 November 2000

Date of mailing of the international search report

09/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/04364

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 409 314 A (ENIRICERCHE SPA) 23 January 1991 (1991-01-23) claims 1-17; examples 1-10 ---	1-10
A	US 4 871 665 A (VIEHWEG HOLGER) 3 October 1989 (1989-10-03) column 3, line 38 - line 49 -----	1-10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/04364

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5372943	A	13-12-1994	AU 4312489 A	18-04-1990
			WO 9003429 A	05-04-1990
			AT 159287 T	15-11-1997
			AU 2255488 A	01-03-1989
			CA 1315725 A	06-04-1993
			DE 3856043 D	20-11-1997
			DE 3856043 T	16-04-1998
			EP 0377582 A	18-07-1990
			IL 87195 A	12-04-1994
			JP 2504225 T	06-12-1990
			JP 2788270 B	20-08-1998
			WO 8901027 A	09-02-1989
US 5674830	A	07-10-1997	AT 150488 T	15-04-1997
			AU 671288 B	22-08-1996
			AU 4560093 A	31-01-1994
			CA 2139308 A	20-01-1994
			DE 69309099 D	24-04-1997
			DE 69309099 T	10-07-1997
			WO 9401575 A	20-01-1994
			EP 0668922 A	30-08-1995
			ES 2100548 T	16-06-1997
			JP 7509126 T	12-10-1995
			ZA 9304881 A	09-01-1995
DE 19735790	A	25-02-1999	AU 9434898 A	08-03-1999
			WO 9908517 A	25-02-1999
			EP 1005269 A	07-06-2000
EP 0409314	A	23-01-1991	CH 680223 A	15-07-1992
			AT 93885 T	15-09-1993
			CA 2021248 A	18-01-1991
			DE 69003044 D	07-10-1993
			DE 69003044 T	20-01-1994
			DK 409314 T	15-11-1993
			ES 2058759 T	01-11-1994
			JP 3088891 A	15-04-1991
			SU 1839631 A	30-12-1993
			US 5196129 A	23-03-1993
US 4871665	A	03-10-1989	DE 3545246 A	25-06-1987
			AT 75259 T	15-05-1992
			DE 3685014 A	27-05-1992
			EP 0229990 A	29-07-1987
			JP 1979330 C	17-10-1995
			JP 7004263 B	25-01-1995
			JP 62163696 A	20-07-1987
			NO 865188 A,B,	22-06-1987



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 27 JUN 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts H 4156 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/04364	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16/05/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 25/05/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N1/00		
Anmelder COGNIS DEUTSCHLAND GMBH et al.		

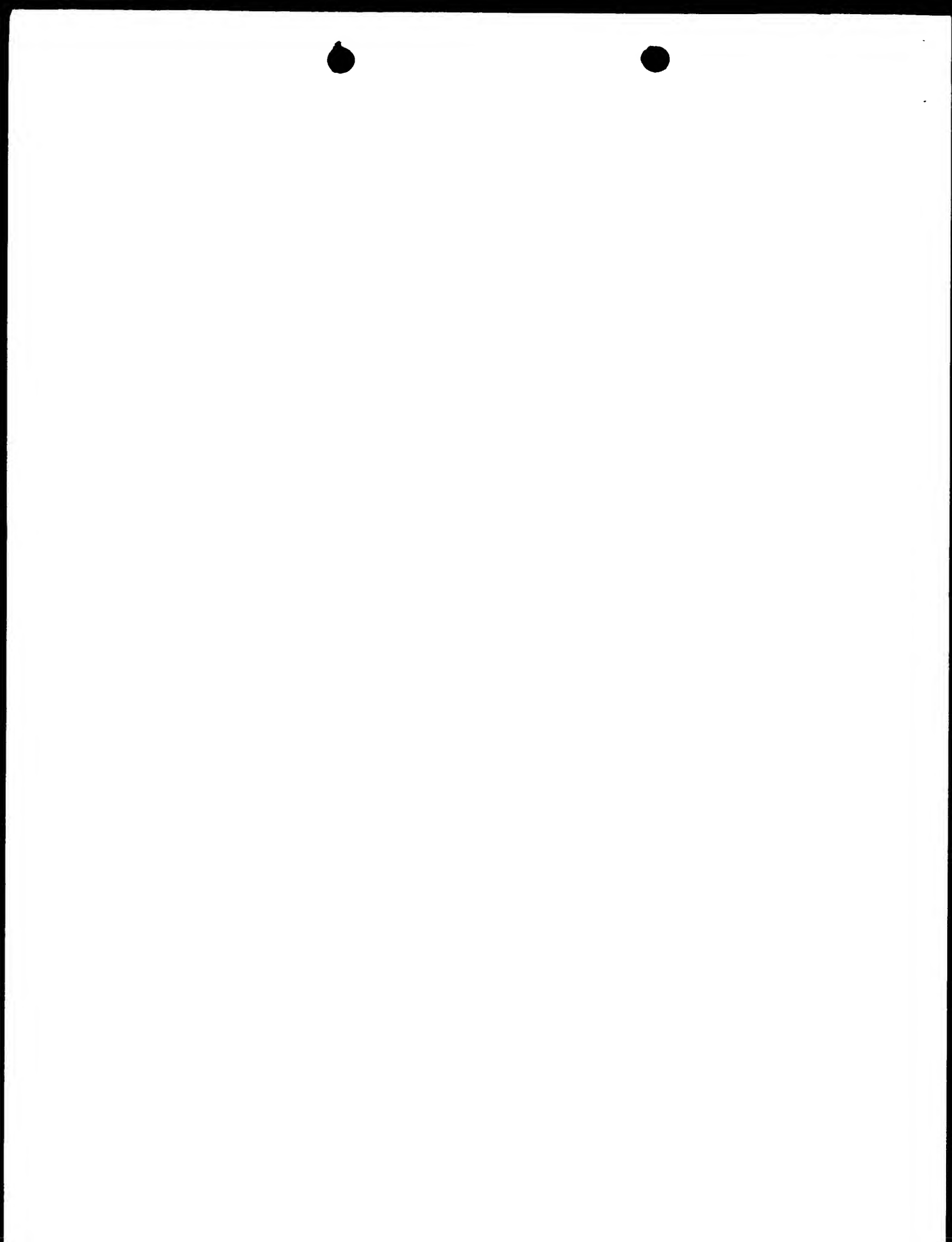
- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 17/11/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 25.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Seranski, P Tel. Nr. +49 89 2399 7846 



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/04364

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-13 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

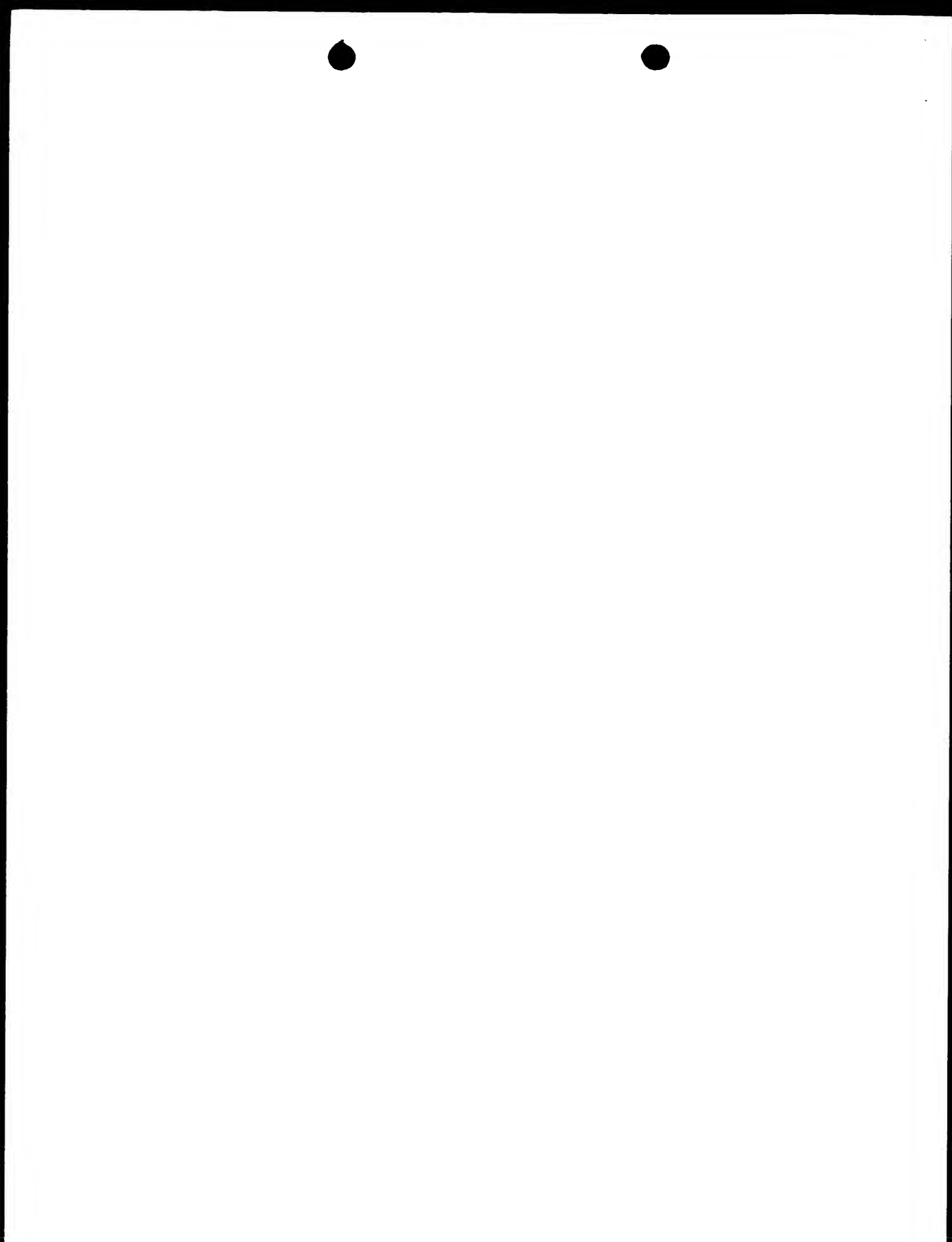
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/04364

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



1. Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1.1 Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

- D1: US-A-5 372 943 (INLOW DUANE ET AL) 13. Dezember 1994 (1994-12-13)
D2: DE 197 35 790 A (HENKEL KGAA) 25. Februar 1999 (1999-02-25)

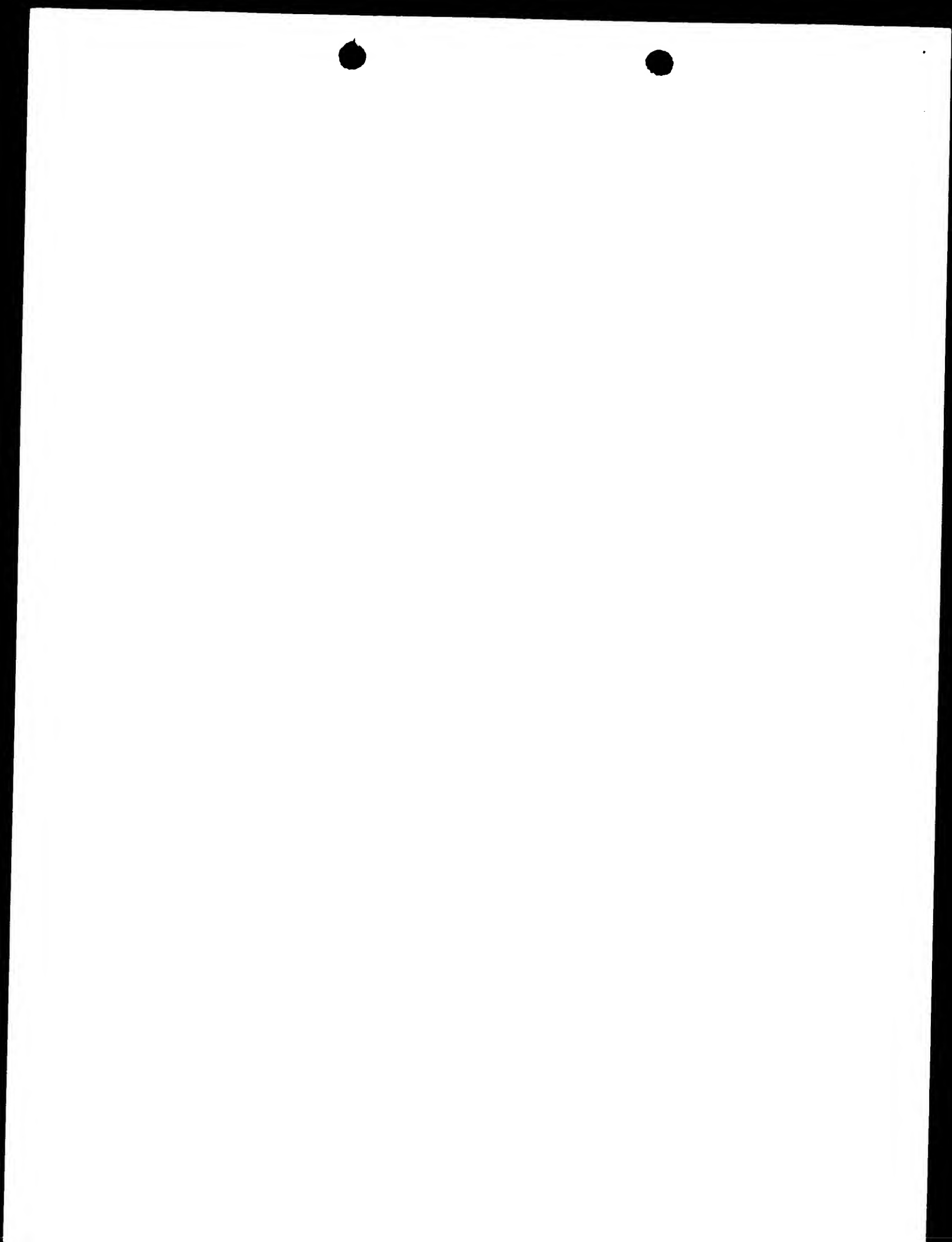
1.2 Das Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart die Verwendung von Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren um Lipide bioverfügbar zu machen (Spalte 3, Zeile 5-24). Das Dokument offenbart ferner die Verwendung von ungesättigten Fettsäuren, Mischungen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren und im Speziellen u.a. Fettsäuremethylester in diesen Mikroemulsionen, das z.B. in Fischöl enthalten ist (Beispiel 1).

1.3 Die Ansprüche 1 und 2 erfüllen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT, da die Verwendung der beanspruchten O/W-Emulsionen bereits in D1 offenbart wurde. D1 offenbart in die Verwendung von Lipiden, u.a. auch Fettsäuremethylester, die zur Gruppe der Fettsäurealkylester gehören, in Form von Mikroemulsionen zum Einsatz in Zellkulturmedien (s. Spalte 3 und 4 der Beschreibung).

Der Unterschied der in den Ansprüchen 1 und 2 beanspruchten Erfindung zum nächsten Stand der Technik liegt in der Definition der Tröpfchengrösse. Das technische Problem kann somit als ein alternatives Verfahren beschrieben werden, das Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren einsetzt, bei dem die Tröpfchengrösse genau auf 1-100 nm definiert ist.

Da diese Tröpfchengrösse ausgehend vom allgemeinen Stand der Technik (z.B. D2, Seite 2, Zeile 27) die normale Tröpfchengrösse, die bei Mikroemulsionsverfahren eingesetzt wird, ist, kann dieses technische Merkmal nicht dazu herangezogen werden, eine erfinderische Tätigkeit zu begründen.

Darüberhinaus kann unter Berücksichtigung des allgemeinen Stands der Technik die Verwendung von pflanzlichen Ölen in besagten Mikroemulsionen als naheliegend



angesehen werden

Somit erfüllen die Ansprüche 1 und 2 nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

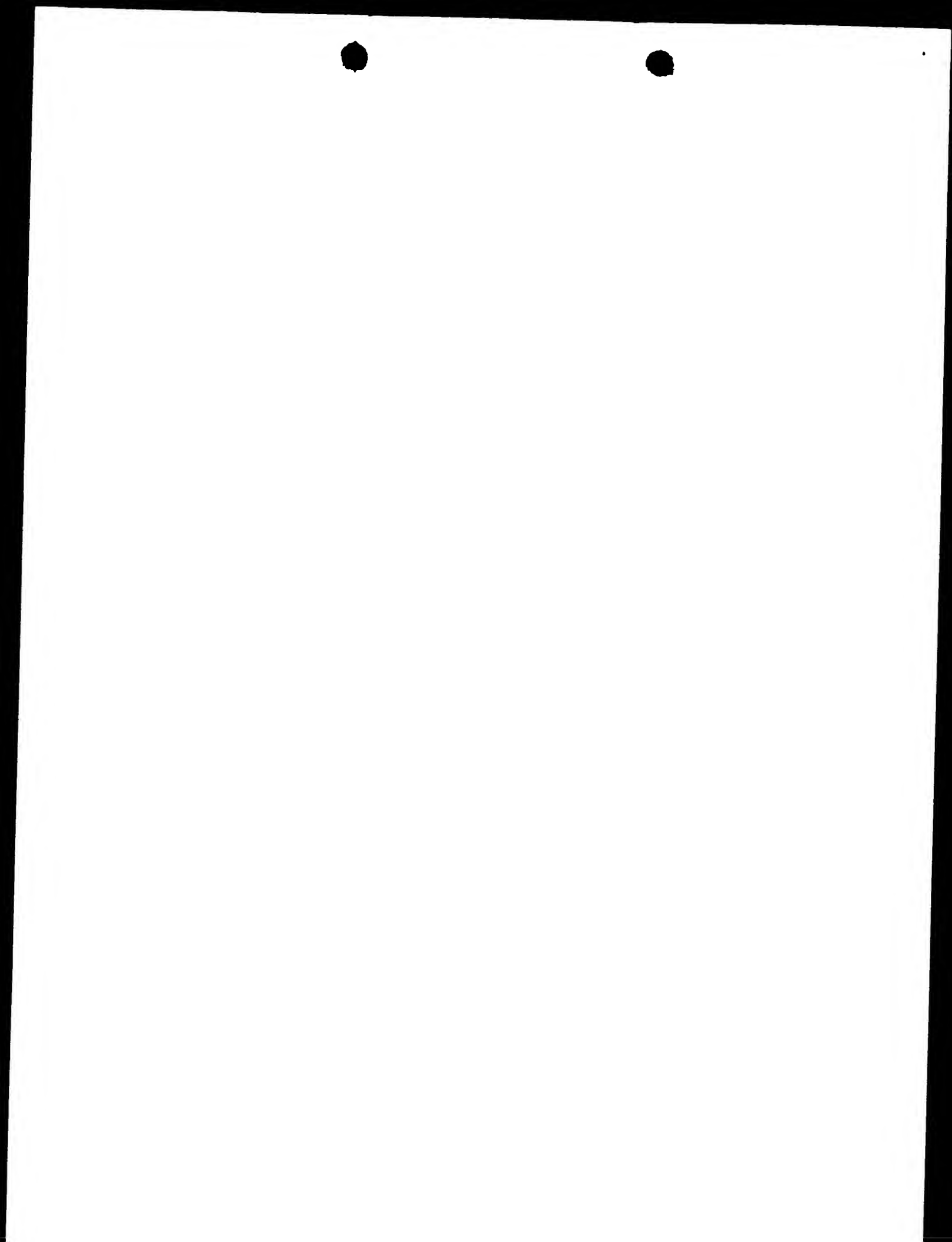
1.4 Die Verwendung von Fettsäuremethylester aus Anspruch 6 oder weiteren Bestandteilen aus den Ansprüchen 7-9 kann ebenfalls nicht als erfinderisch angesehen werden, da zum einen die Verwendung solcher spezifischen Verbindung dem Fachmann aus dem generellen Stand der Technik naheliegend ist und darüber hinaus sich aus diesen spezifischen Formulierungen der Mikroemulsionen auch kein technischer Effekt herleiten lässt.

1.5 Den Einschränkungen der Unteransprüche 3-5 und 10 in Bezug auf die Tröpfchengröße und die spezifischen Gewichtsverhältnisse liegt ebenfalls kein technischer Effekt zugrunde, somit erfüllen diese Ansprüche nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

2. Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Die Verwendung des Ausdrucks "vorzugsweise" in den Ansprüchen 3-5 und 10 lässt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT).



Verwendung von Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren.

Bei der Synthese komplexer Naturstoffe oder sonstiger organischer Verbindungen, beispielsweise Antibiotika, werden zunehmend mikrobiologische Verfahren eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Stoffumwandlung unter anaeroben oder aeroben Bedingungen, bei der Mikroorganismen, oder Teile von Mikroorganismen, insbesondere aber Bakterien oder Pilze beteiligt sind. Für derartige Verfahren werden in der Fachwelt verschiedene, nicht immer klar voneinander abgegrenzte Ausdrücke, wie "Bioconversion", "Biotransformation" oder "Fermentation" verwendet. Der letztere Ausdruck wird auch im Rahmen der vorliegenden Anmeldung für solche Verfahren verwendet, bei denen Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, zur Umwandlung bzw. Synthese von chemischen Verbindungen verwendet werden.

Für die Entwicklung und Optimierung von Fermentationsprozessen ist insbesondere das Reaktionsmedium, in dem die mikrobiologische Umwandlung stattfindet, von Bedeutung. Das Reaktionsmedium, in aller Regel eine wäßrige Lösung oder Dispersion, beeinflusst insbesondere die Ausbeute und Effizienz des Verfahrens. Die Mikroorganismen benötigen als Nährstoffe Kohlenstoff, Stickstoff und bestimmte Spurenelemente in gebundener Form, z.B. Calcium, Eisen, Phosphor oder Zink, um eine erfolgreiche Metabolisierung zu den gewünschten Produkten möglich zu machen. Weiterhin muß regelmäßig ein bestimmter, meistens enger Temperatur- und pH-Bereich eingehalten werden. Zu weiteren Einzelheiten sei hier auf das Lehrbuch von W. *Crueger*/A. *Crueger*, Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, 2. Auflage 1984, R. Oldenbourg Verlag, verwiesen. Insbesondere Kapitel 5 dieses Werkes beschäftigt sich mit den Grundlagen der Fermentationstechnik. Diese Literaturstelle gehört daher auch ausdrücklich zur Offenbarung der vorliegenden Anmeldung. Als Nährstoffe für die Mikroorganismen werden neben energiereichen Zuckern und deren Derivaten in vielen Verfahren zusätzlich natürliche Fette und Öle, sowie Derivate dieser Stoffklassen, wie Glycerin, Glyceride, Fettsäuren oder

Fettsäureester eingesetzt. Selbstverständlich dürfen die Kulturmedien keine Inhaltsstoffe aufweisen, die die Metabolisierung der Mikroorganismen negativ beeinflussen können.

Aus der DE 37 38 812 A1 ist beispielsweise ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von alpha-omega-Dicarbonsäuren bekannt, wobei Bakterien des Stamms *Candida tropicalis* Methyllaurat in die gewünschten Dicarbonsäuren umwandeln. Die Umwandlung findet in einem wäßrigen Medium bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Temperatur von 30 °C statt. Das Medium enthält, neben den Mikroorganismen als Energielieferant Glucose, weiterhin als Emulgator ethoxyliertes Sorbitanmonooleat, Hefeextrakt, Maisquellwasser sowie anorganische N- und P-Quellen. Dem Medium wird dann das Methyllaurat zudosiert. Der Schrift ist kein Hinweis auf den Emulsionstyp zu entnehmen, der sich im Fermenter ausbildet oder in der das Methyllaurat dem Medium zudosiert wird. Aus der EP 0 535 939 A1 ist ein Verfahren zur Herstellung von omega-9-mehrfach ungesättigten Fettsäuren bekannt, wobei in einem wäßrigen Kulturmedium geeignete Mikroorganismen in Gegenwart von Zuckern als Energielieferanten und anorganischen oder organischen Stickstoffquellen, sowie in Gegenwart von Fettsäuremethylestern die gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren produzieren.

Es sind aber auch Verfahren bekannt, wo nur Fettstoffe der oben bezeichneten Art als Energielieferanten verwendet werden. Dies ist besonders von wirtschaftlichem Interesse, da derartige Fettstoffe in der Regel preiswerter sind als Zucker, Stärke und ähnliche Verbindungen. Park et al. beschreiben (Park et al., Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 82, No. 2, 183-186, 1996) einen Fermentationsprozess zur Herstellung von Tylosin, bei dem Mikroorganismen des Stammes *Streptomyces fradiae* in einem wäßrigen Medium verwendet werden, daß als einzige Kohlenstoffquelle Rapsöl in Ausgangsmengen von etwa 60 g/l enthielt.

Bei Fermentationsverfahren spielt außerdem der Sauerstoffgehalt im Medium bzw. der Fermentationsbrühe, eine entscheidende Rolle. Dabei kommt dem Sauerstoff bei aeroben Prozessen die Rolle eines Substrates zu. Entscheidend ist, ob ein für das jeweilige Verfahren ausreichender Sauerstoffübergang von der Gas- in die Flüssigphase, die die Mikroorganismen enthält, stattfinden kann. Ein wichtiger Parameter stellt die spezifische Austauschfläche dar, die in der Regel indirekt über den Sauerstoffübergangskoeffizienten k_{La} bestimmt wird (vergl.

Literaturstelle *Crueger*, Kapitel 5, Seite 71 ff). Die Einstellung des optimalen Sauerstoffeintrags erfolgt typischerweise durch Rühren der Fermentationsbrühe, wobei der Sauerstoff bzw. die Luft mit der Flüssigkeit vermischt wird und so an den Grenzflächen der Gasaustausch stattfindet. Allerdings kann der erhebliche mechanische Energieeintrag durch starkes Rühren, wie Park et al. ausführen, auch Teile der Kultur zerstören, und so die Ausbeute des Verfahrens verringern. Die abgestorbenen Mikroorganismen werden außerdem selbst weiter abgebaut und können durch die gebildeten Abbauprodukte zu einer Vergiftung der Kultur führen, die eine wirtschaftliche Produktion unmöglich macht. Aus der Arbeit von Goma und Rols (G. Goma, J.L. Rols, *Biotech. Let.*, Vol 13, No. 1, Seiten 7 bis 12, 1991) ist bekannt daß die Verwendung von Sojaöl in Fermentationsverfahren zur Herstellung von Antibiotika zu einer Verbesserung des Sauerstoffübergangskoeffizienten k_{La} führt, was bei gleichem Energieeintrag (Rühren) zu einem Anstieg der Ausbeute des Gesamtverfahrens führen kann.

Der vorliegenden Erfindung lag nun die Aufgabe zugrunde, Fermentationsverfahren so zu verbessern, daß einerseits preiswerte Kohlenstoffquellen eingesetzt werden können und andererseits eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff gewährleistet ist, ohne daß eine unzulässig hohe mechanische Belastung der Mikroorganismen durch Rühren auftritt. Es sollte eine Weg gefunden werden, den mechanischen Energieeintrag bei Fermentationsverfahren zu minimieren, ohne daß es zu einer Verringerung der Ausbeute kommt. Vorzugsweise soll eine Erhöhung der Ausbeute trotz verringertem Energieeintrag möglich sein.

Es wurde gefunden, daß die Verwendung von speziellen, feinteiligen Öl-in-Wasser (O/W) Emulsionen die obige Aufgabe löst.

In einer ersten Ausführungsform wird die Verwendung von O/W-Emulsionen in Fermentationsverfahren beansprucht, wobei diese Emulsionen mindestens Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase enthalten und die Ölphase eine oder mehrere Verbindungen aus den Gruppen

- a) der Fettsäurealkylester und/oder
- b) der Triglyceride pflanzlichen Ursprungs

enthalten, wobei die Emulsionen eine Tröpfchengröße von 1 bis 100 nm aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Emulsionen zeichnen sich insbesondere durch ihre Feinteiligkeit aus. Es handelt sich dabei um sogenannte Mikroemulsionen, die definiert sind als makroskopisch homogene, optisch transparente, häufig niedrigviskose, thermodynamisch stabile Mischungen aus zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten und mindestens einem nichtionischen oder einem ionischen Tensid, das vorzugsweise zwei hydrophobe Reste enthält. Die Bildung einer Mikroemulsion bedingt eine Situation, bei der die Öl-Wasser-Grenzflächenspannung sich dem Wert Null annähert. In der Regel ist es notwendig, zusätzlich zu mindestens einem nichtionischen Tensid weitere Cotenside zuzusetzen, um diese spezielle Emulsionsform zu erreichen. Vergleiche hierzu die Literaturstelle "Introduction to Colloid and Surface Chemistry, D.J. Shaw, Butterworth, 1992, Seiten 269 und 270". Die Tröpfchengröße der erfindungsgemäß verwendeten Emulsionen beträgt 1 bis 100 nm. Vorzugsweise liegt die Tröpfchengröße im Bereich von 10 bis 80 nm, insbesondere im Bereich von 10 bis 30 nm. Die Feinteiligkeit der Öltröpfchen führt zu einer großen Oberfläche zwischen Öl- und Wasserphase und ermöglicht so einen schnellen Kontakt zwischen den in der wäßrigen Phase enthaltenen Mikroorganismen und der die Nährstoffe enthaltenden Ölphase. Durch die große Oberfläche wird auch der Gasaustausch, insbesondere von Sauerstoff und CO₂, vereinfacht. Zusätzlich verringert sich die Viskosität der Emulsion und somit des gesamten Fermentationsmediums. In der Folge ist es daher möglich die Rührgeschwindigkeit des Fermentationsmediums deutlich zu verringern wodurch eine Erhöhung der Ausbeute des Fermentationsprozeß ermöglicht wird.

Die Mikroemulsionen werden erfindungsgemäß dem wäßrigen Fermentationsmedium, welches die Mikroorganismen sowie ggf. weitere Hilfs- und Zusatzstoffe enthält, zudosiert. Die Einzelheiten dieses Verfahrens, insbesondere die Geschwindigkeit und Menge der zudosierten Emulsion, ergeben sich aus der Art der Mikroorganismen und des gewählten Fermentationsverfahrens und können vom Fachmann an die spezifischen Gegebenheiten angepaßt werden.

Die Mikroemulsionen enthalten, neben Wasser, eine Ölphase, die Verbindungen aus der Gruppe der Fettsäurealkylester a) oder der nativen pflanzlichen Öle und deren Derivate b) enthält. Es handelt sich bei den Gruppen a) und b) um hydrophobe, in Wasser nicht oder nur sehr gering lösliche Verbindungen, die sowohl als Nährstoffe, also Energielieferanten, für die

im Fermentationsprozeß eingesetzten Bakterien dienen können, die aber auch Ausgangsstoffe (Substrate) für die durch Biokonversion gewünschten Produkte darstellen können.

Geeignete Methylester der Gruppe a) leiten sich insbesondere ab von gesättigten, ungesättigten, linearen oder verzweigten Fettsäuren mit insgesamt 7 bis 23 Kohlenstoffatomen. Es handelt sich also um Verbindungen der Formel (I)



wobei R^1 für einen Alkylrest mit 6 bis 22 C-Atomen steht und R^2 ein Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen ist. Bevorzugt sind Methyl- und Ethylreste. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Methylestern als Komponente a). Die Ester der Formel (I) bzw. die Methylester können auf übliche Weise erhalten werden, z.B. durch Umesterung von Triglyceriden mit Methanol und anschließender Destillation. Geeignete Fettsäuren sind die Capron-, Heptan-, Capryl-, Perlagon-, Caprin-, Undecan-, Laurin-, Tridecan-, Myristin-, Pentadecan-, Palmitin-, Heptadecan-, Stearin-, Nonadecan-, Arachin- und Behensäure. Ungesättigte Vertreter sind beispielsweise Laurolelin-, Myristolein-, Palmitolein-, Petroselaidin-, Öl-, Elaidin-, Ricinol-, Linol-, Linolaidin-, Linolen-, Gadolein-, Arachidon und Erucasäure. Auch Mischungen der Methylester dieser Säuren sind geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung solcher Mikroemulsionen, die Methylester aus der Gruppe Methyloleat, Methylpamitat, Methylstearat und/oder Methylpelargonat enthalten. Es können aber auch Methylester auf Basis natürlicher Fettsäuremischungen "eingesetzt werden", wie sie beispielsweise aus Lein-, Kokos-, Palm-, Palmkern-, Oliven-, Ricinus-, Rüb-, Sesam-, Soja- oder Sonnenblumenöl (bei Raps- und Sonnenblumenöl jeweils neue und alte Züchtungen) erhalten werden.

Geeignete Verbindungen der Gruppe b) sind native Öle pflanzlichen Ursprungs. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um Triglyceridmischungen, wobei das Glycerin mit länger-kettigen Fettsäuren jeweils vollständig verestert ist. Besonders geeignete pflanzliche Öle sind ausgewählt aus der Gruppe Erdnuß-, Kokos-, Lein-, Palm-, Oliven-, Palmkern-, Ricinus-, Raps-, Sesam-, Soja- und Sonnenblumenöl.

Erdnußöl enthält durchschnittlich (bezogen auf Fettsäure) 54 Gew.-% Ölsäure, 24 Gew.-% Linolsäure, 1 Gew.-% Linolensäure, 1 Gew.-% Arachinsäure, 10 Gew.-% Palmitinsäure, sowie 4 Gew.-% Stearinsäure. Der Schmelzpunkt beträgt 2 bis 3 °C.

Leinöl enthält typischerweise 5 Gew.-% Palmitin-, 4 Gew.-% Stearin-, 22 Gew.-% Öl-, 17 Gew.-% Linol- und 52 Gew.-% Linolensäure. Die Iodzahl liegt im Bereich von 155 bis 205, Die Verseifungszahl ist 188 bis 196 und der Schmelzpunkt liegt bei etwa - 20 °C.

Kokosöl enthält an Fettsäuren etwa 0,2 bis 1 Gew.-% Hexan-, 5 bis 8 Gew.-% Octan-, 6 bis 9 Gew.-% Decan-, 45 bis 51 Gew.-% Laurin-, 16 bis 19 Gew.-% Myristin-, 9 bis 11 Gew.-% Palmitin-, 2 bis 3 Gew.-% Stearin-, weniger als 0,5 Gew.-% Behen-, 8 bis 10 Gew.-% Öl- und bis 1 Gew.-% Linolsäure. Die Iodzahl liegt im Bereich von 7,5 bis 9,5 , die Verseifungszahl liegt bei 0,88 bis 0,90. Der Schmelzpunkt liegt bei 20 bis 23 °C.

Olivenöl enthält überwiegend Ölsäure (vergl. Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., 39, 112 bis 114, 1985). Palmöl enthält als Fettsäurekomponenten etwa 2 Gew.-% Myristin-, 42 Gew.-% Palmitin-, 5 Gew.-% Stearin-, 41 Gew.-% Öl-, 10 Gew.-% Linolsäure. Palmkernöl ist typischerweise in Bezug auf das Fettsäurespektrum wie folgt zusammengesetzt: 9 Gew.-% Capron/Capryl/Caprin-, 50 Gew.-% Laurin-, 15 Gew.-% Myristin-, 7 Gew.-% Palmitin-, 2 Gew.-% Stearin-, 15 Gew.-% Öl- und 1 Gew.-% Linolsäure.

Rapsöl enthält als Fettsäurekomponenten typischerweise etwa 48 Gew.-% Erucasäure, 15 Gew.-% Ölsäure, 14 Gew.-% Linolsäure, 8 Gew.-% Linolensäure, 5 Gew.-% Icosensäure, 3 Gew.-% Palmitinsäure, 2 Gew.-% Hexadecensäure und 1 Gew.-% Docosadiensäure. Rapsöl aus neuer Züchtung ist bezüglich der ungesättigten Anteile angereichert. Typische Fettsäureanteile sind hier Erucasäure 0,5 Gew.-%, Ölsäure 63 Gew.-%, Linolsäure 20 Gew.-%, Linolensäure 9 Gew.-%, Icosensäure 1 Gew.-%, Palmitinsäure 4 Gew.-%, Hexadecensäure 2 Gew.-% und Docosadiensäure 1 Gew.-%.

Ricinusöl besteht zu 80 bis 85 Gew.-% aus dem Glycerid der Ricinolsäure, daneben sind zu etwa 7 Gew.-% Glyceride der Öl-, zu 3 Gew.-% Glyceride der Linol- und zu etwa 2 Gew.-% die Glyceride der Palmitin- und der Stearinsäure enthalten.

Sojaöl enthält zu 55 bis 65 Gew.-% der Gesamtfettsäuren mehrfach ungesättigte Säuren, insbesondere Linol- und Linolensäure. Ähnlich ist die Situation beim Sonnenblumenöl , dessen typisches Fettsäurespektrum, bezogen auf Gesamtfettsäure wie folgt aussieht: ca. 1 Gew.-% Myristin-, 3 bis 10 Gew.-% Palmitin-, 14 bis 65 Gew.-% Öl- und 20 bis 75 Gew.-% Linolsäure.

Alle obigen Angaben über den Fettsäureanteile in den Triglyceriden sind bekanntermaßen abhängig von der Qualität der Rohstoffe und können daher zahlenmäßig schwanken. Besonders bevorzugt sind solche Mikroemulsionen, die Nährstoffe der Gruppe b), ausgewählt aus der Gruppe Kokosöl, Sonnenblumenöl und/oder Rapsöl enthalten.

Wichtige Bestandteile der erfindungsgemäß verwendeten Mikroemulsionen sind die eingesetzten Emulgatoren bzw. Emulgatorensysteme. Vorzugsweise werden als Emulgatoren nichtionische Emulgatoren, insbesondere ethoxylierte Fettalkohole und Fettsäuren eingesetzt.

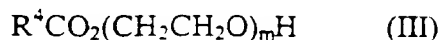
Fettalkoholethoxylate im Sinne der erfindungsgemäßen Lehre folgen der allgemeinen Formel (II)



wobei R^3 für einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten Alkylrest mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen steht und n eine Zahl von 1 bis 50 bedeutet. Besonders bevorzugt sind solche Verbindungen der Formel (II), in der n für eine Zahl von 1 bis 35 und insbesondere von 1 bis 15 steht. Besonders bevorzugt sind weiterhin solche Verbindungen der Formel (II), in der R^3 für einen Alkylrest mit 16 bis 22 Kohlenstoffatomen steht.

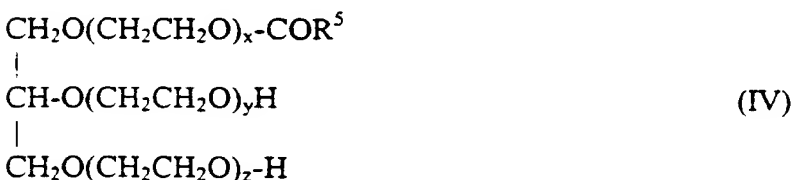
Die Verbindungen der Formel (II) werden in an sich bekannter Weise durch Umsetzung von Fettalkoholen mit Ethylenoxid unter Druck, ggf. in Gegenwart saurer oder basischer Katalysatoren erhalten. Typische Beispiele sind Capronalkohol, Caprylalkohol, 2-Ethylhexylalkohol, Caprinalkohol, Laurylalkohol, Isotridecylalkohol, Myristylalkohol, Cetylalkohol, Palmoleylalkohol, Stearylalkohol, Isostearylalkohol, Oleylalkohol, Elaidylalkohol, Petroselinylalkohol, Linolylalkohol, Linolenylalkohol, Elaeostearylalkohol, Arachylalkohol, Gadoleylalkohol, Behenylalkohol, Erucylalkohol und Brassidylalkohol sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Hochdruckhydrierung von technischen Methylestern auf Basis von Fetten und Ölen oder Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese sowie als Monomerfraktion bei der Dimerisierung von ungesättigten Fettalkoholen anfallen. Bevorzugt sind technische Fettalkohole mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Kokos-, Palm-, Palmkern- oder Talgfettalkohol.

Fettsäureethoxylate, die ebenfalls als Emulgator oder Emulgatorkomponente in Betracht kommen, folgen vorzugsweise der Formel (III),



in der R^4 für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und m für Zahlen von 5 bis 50 und vorzugsweise 15 bis 35 steht. Typische Beispiele sind Anlagerungsprodukte von 20 bis 30 Mol Ethylenoxid an Laurinsäure, Isotridecansäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmoleinsäure, Stearinsäure, Isostearinsäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Petroselinäure, Linolsäure, Linolensäure, Elaeostearinsäure, Arachinsäure, Gadoleinsäure, Behensäure und Erucasäure sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Druckspaltung von natürlichen Fetten und Ölen oder bei der Reduktion von Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese anfallen. Vorzugsweise werden Anlagerungsprodukte von 20 bis 30 Mol Ethylenoxid an Fettsäuren mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen eingesetzt.

Partialglyceride, die ebenfalls als Emulgatoren in Betracht kommen, folgen vorzugsweise der Formel (IV),



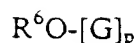
in der $CO R^5$ für einen linearen oder verzweigten Acylrest mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und x , y und z in Summe für 0 oder für Zahlen von 1 bis 50, vorzugsweise 15 bis 35 steht. Typische Beispiele für im Sinne der Erfindung geeignete Partialglyceride sind Laurinsäuremonoglycerid, Kokosfettsäuremonoglycerid, Palmitinsäuremonoglycerid, Stearinsäuremonoglycerid, Isostearinsäuremonoglycerid, Ölsäuremonoglycerid und Talgfettsäuremonoglycerid sowie deren Addukte mit 5 bis 50 und vorzugsweise 20 bis 30 Mol Ethylenoxid. Vorzugsweise werden Monoglyceride bzw. technische Mono/Diglyceridgemische mit überwiegendem Monoglyceridanteil der Formel (IV) eingesetzt, in der $CO R^5$ für einen linearen Acylrest mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen steht.

Als weitere geeignete Emulgatoren kommen beispielsweise nichtionogene Tenside aus einer der folgenden Gruppen in Frage:

- (I) Anlagerungsprodukte von 2 bis 30 Mol Ethylenoxid und/ oder 0 bis 5 Mol Propylenoxid an lineare Fettalkohole mit 8 bis 22 C-Atomen;
- (II) Glycerinmono- und -diester und Sorbitanmono- und -diester von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen und deren Ethylenoxidanlagerungsprodukte;
- (III) Alkylmono- und -oligoglycoside mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen im Alkylrest und deren ethoxylierte Analoga;
- (IV) Anlagerungsprodukte von 15 bis 60 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;
- (V) Polyol- und insbesondere Polyglycerinester wie z.B. Polyglycerinpolyricinoleat oder Polyglycerinpoly-12-hydroxystearat. Ebenfalls geeignet sind Gemische von Verbindungen aus mehreren dieser Substanzklassen;
- (VI) Anlagerungsprodukte von 2 bis 15 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;
- (VII) Partialester auf Basis linearer, verzweigter, ungesättigter bzw. gesättigter $C_{12/22}$ -Fettsäuren, Ricinolsäure sowie 12-Hydroxystearinsäure und Glycerin, Polyglycerin, Pentaerythrit, Dipentaerythrit, Zuckeralkohole (z.B. Sorbit) sowie Polyglucoside (z.B. Cellulose);
- (VIII) Wollwachsalkohole;
- (IX) Polyalkylenglycole.

Die Anlagerungsprodukte von Ethylenoxid und/oder von Propylenoxid an Glycerinmono- und -diester sowie Sorbitanmono- und -diester von Fettsäuren oder an Ricinusöl stellen bekannte, im Handel erhältliche Produkte dar. Es handelt sich dabei um Homologengemische, deren mittlerer Alkoxyierungsgrad dem Verhältnis der Stoffmengen von Ethylenoxid und/oder Propylenoxid und Substrat, mit denen die Anlagerungsreaktion durchgeführt wird, entspricht.

Besonders bevorzugt ist die Mitverwendung von Emulgatoren der Gruppe (III), also der Alkylglycoside. Alkyl- und Alkenyloligoglykoside stellen bekannte nichtionische Tenside dar, die der Formel (V) folgen,



(V)

in der R^6 für einen Alkyl- und/oder Alkenylrest mit 4 bis 22 Kohlenstoffatomen, G für einen Zuckerrest mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen und p für Zahlen von 1 bis 10 steht. Sie können nach den einschlägigen Verfahren der präparativen organischen Chemie erhalten werden. Stellvertretend für das umfangreiche Schrifttum sei hier auf die Übersichtsarbeit von Biermann et al. in *Starch/Stärke* 45, 281 (1993), B.Salka in *Cosm. Toil.* 108, 89 (1993) sowie J.Kahre et al. in *SÖFW-Journal* Heft 8, 598 (1995) verwiesen.

Die Alkyl- und/oder Alkenyloglykoside können sich von Aldosen bzw. Ketosen mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise der Glucose ableiten. Die bevorzugten Alkyl- und/oder Alkenyloglykoside sind somit Alkyl- und/oder Alkenyloglucoside. Die Indexzahl p in der allgemeinen Formel (V) gibt den Oligomerisierungsgrad (DP), d. h. die Verteilung von Mono- und Oligoglykosiden an und steht für eine Zahl zwischen 1 und 10. Während p in einer gegebenen Verbindung stets ganzzahlig sein muß und hier vor allem die Werte $p = 1$ bis 6 annehmen kann, ist der Wert p für ein bestimmtes Alkyloligoglykosid eine analytisch ermittelte rechnerische Größe, die meistens eine gebrochene Zahl darstellt. Vorzugsweise werden Alkyl- und/oder Alkenyloglykoside mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad p von 1,1 bis 3,0 eingesetzt. Aus anwendungstechnischer Sicht sind solche Alkyl- und/oder Alkenyloglykoside bevorzugt, deren Oligomerisierungsgrad kleiner als 1,7 ist und insbesondere zwischen 1,2 und 1,4 liegt. Der Alkyl- bzw. Alkenylrest R^6 kann sich von primären Alkoholen mit 4 bis 11, vorzugsweise 8 bis 10 Kohlenstoffatomen ableiten. Typische Beispiele sind Butanol, Capronalkohol, Caprylalkohol, Caprinalkohol und Undecylalkohol sowie deren technische Mischungen, wie sie beispielsweise bei der Hydrierung von technischen Fettsäuremethylestern oder im Verlauf der Hydrierung von Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese erhalten werden. Bevorzugt sind Alkyloligoglucoside der Kettenlänge C_8 - C_{10} ($DP = 1$ bis 3), die als Vorlauf bei der destillativen Auftrennung von technischem C_8 - C_{18} -Kokosfettalkohol anfallen und mit einem Anteil von weniger als 6 Gew.-% C_{12} -Alkohol verunreinigt sein können sowie Alkyloligoglucoside auf Basis technischer $C_{9/11}$ -Oxo-alkohole ($DP = 1$ bis 3). Der Alkyl- bzw. Alkenylrest R^6 kann sich ferner auch von primären Alkoholen mit 12 bis 22, vorzugsweise 12 bis 14 Kohlenstoffatomen, ableiten. Typische Beispiele sind Laurylalkohol,

Myristylalkohol, Cetylalkohol, Palmoleylalkohol, Stearylalkohol, Isostearylalkohol, Oleylalkohol, Elaidylalkohol, Petroselinylalkohol, Arachylalkohol, Gadoleylalkohol, Behenylalkohol, Erucylalkohol, Brassidylalkohol sowie deren technische Gemische, die wie oben beschrieben erhalten werden können. Bevorzugt sind Alkyloligoglucoside auf Basis von gehärtetem C_{12/14}-Kokosalkohol mit einem DP von 1 bis 3. Werden Alkylglycoside der Formel (V) als Emulgatoren verwendet, kann es vorteilhaft sein, geringe Mengen an Polyhydroxycarbonsäuren, vorzugsweise Zitronensäure, als Formulierungshilfsstoffe mit zu verwenden. Üblicherweise werde dann die Polyhydroxysäuren in Mengen von 0,1 bis 3,0 Gew.-% verwendet, vorzugsweise in Mengen von 0,1 bis 1,0 Gew.-%.

Die erfindungsgemäß verwendeten Mikroemulsionen enthalten vorzugsweise von 20 bis 90 Gew.-% Wasser, insbesondere von 30 bis 80 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt von 30 bis 60 Gew.-%. Der Rest auf 100 Gew.-% entfällt auf die Ölphase sowie Emulgatoren und ggf. weitere Hilfs- und Zusatzstoffe. Die Ölphase selbst ist vorzugsweise in Mengen von 10 bis 80 Gew.-%, insbesondere von 20 bis 70 Gew.-% und insbesondere von 25 bis 55 Gew.-% enthalten. Dabei enthält die Ölphase vorzugsweise ausschließlich die Komponenten a) oder b) bzw. Mischungen dieser Komponenten. Besonders bevorzugt ist die Verwendung solcher Emulsionen, die Öl- und Wasserphase im Gewichtsverhältnis von 1 : 1 enthalten. Die Emulgatoren, bzw. Emulgatorensysteme sind vorzugsweise in Mengen von 10 bis 50 Gew.-%, insbesondere in Mengen von 15 bis 45 Gew.-% und besonders bevorzugt in Mengen von 20 bis 40 Gew.-% enthalten.

Die beschriebenen Mikroemulsionen können erfindungsgemäß in Fermentationsprozessen aller Art eingesetzt werden. Dabei können alle dem Fachmann bekannten Verfahrensausgestaltungen, z.B. Batch- oder Fed-Batch sowie kontinuierliche Fermentation verwendet werden. Auch sind alle dem Fachmann bekannten Fermentersysteme einsetzbar. Zu den Einzelheiten siehe *Crueger*, Seiten 50 bis 70. Die Verwendung der Mikroemulsionen ist auch nicht auf bestimmte Mikroorganismen begrenzt, vielmehr lassen sich die Emulsionen zur Herstellung oder Umwandlung aller dem Fachmann durch Fermentation bekannten Verbindungen einsetzen. Neben den klassischen Fermentationsverfahren, die überwiegend zu Synthese von Antibiotika eingesetzt werden, (vergl. *a.a.O. Crueger*, Seiten 197 bis 242) eignen sich die beschriebenen Emulsionen aber auch zum Einsatz bei mikrobiellen Transformationen ("Bioconversion"), z.B. der Transformation von Steroiden und Sterinen,

von Antibiotika und Pestiziden oder der Herstellung von Vitaminen (vergl. *Crueger*, Seiten 254 bis 273). - Bevorzugt ist aber die Verwendung in Fermentationsprozessen zur Herstellung von Antibiotika, beispielsweise Cephalosporinen, Tylosin oder Erythromycin.

In der Regel werden die Mikroemulsionen der wäßrigen Fermentationsbrühe, welche die Mikroorganismen sowie die Stickstoffquelle und Spurenelemente und ggf. weitere Hilfsstoffe, insbesondere Entschäumer, enthält, in geeigneter Weise zudosiert. Als Stickstoffquellen kommen beispielsweise in Betracht: Pepton, Hefe- oder Malzextrakt, Maisquellwasser, Harnstoff oder Lecithine. Die Spurenelemente können in Form anorganischer Salze anwesend sein, beispielsweise Natrium- oder Kaliumnitrat, Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat, Eisensulfat etc. Es kann auch vorteilhaft sein, den Mikroemulsionen selbst weitere Zusatzstoffe, wie Entschäumer oder Stickstoffquellen zuzusetzen.

Beispiele

Es wurden verschiedene Mikroemulsionen durch Mischen der Ausgangsstoffe hergestellt. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Tröpfchengröße wurde mit einem Malvern Mastersizer 2000 gemessen. Die Emulsionen eignen sich beispielsweise als alleinige Nährstoffquelle für Fermentationsprozessen und können direkt der wäßrigen Fermentationsbrühe zugesetzt werden.

Tabelle 1a

	Gew.- %	Gew.- %	Gew.- %	Gew.- %
Methyloleat				32,44
Methylaurat			30,95	
Methylpelargonat		29,61		
Rübölfettsäuremethylester	32,35			
Wasser	34,27	32,04	30,24	34,18
Alkylglycosid	25,22	31,55	30,95	25,3
Glycerinoleat	7,91	6,55	7,62	7,84
Zitronensäure	0,25	0,24	0,24	0,24
Aussehen	klar	klar	klar	klar
Tröpfchengröße	< 80 nm	< 80 nm	< 80 nm	< 80 nm

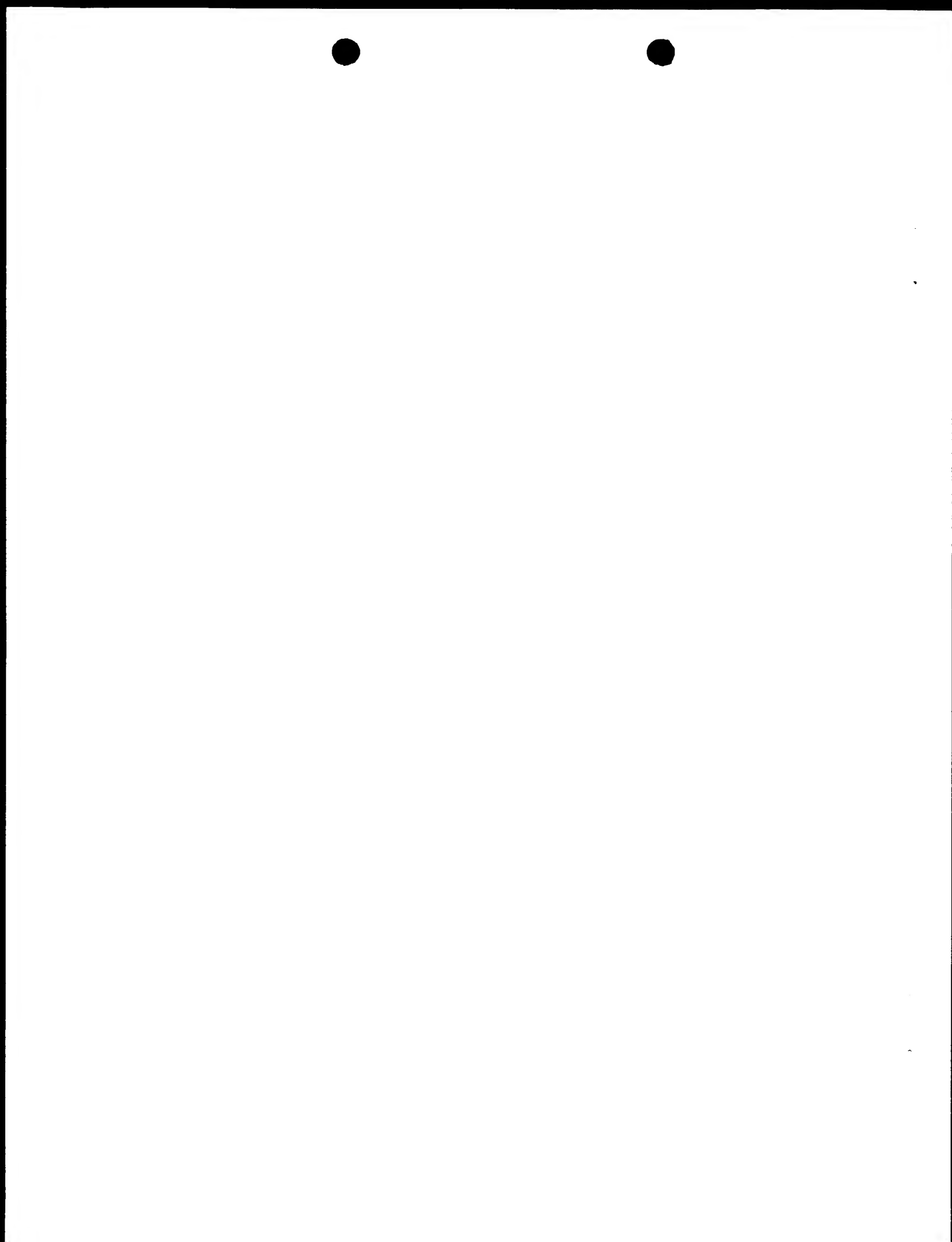
Patentansprüche

1. Verwendung von O/W-Emulsionen, enthaltend mindesten Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase, die eine oder mehrere Verbindungen, ausgewählt aus den Gruppen
 - a) der Fettsäurealkylester und/oder
 - b) der Triglyceride pflanzlichen Ursprungsenthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Emulsion eine Tröpfchengröße im Bereich von 1 bis 100 nm aufweist, in Fermentationsverfahren.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Komponente a) Fettsäuremethylester verwendet werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die eine mittlere Tröpfchengröße im Bereich von 10 bis 80 nm, vorzugsweise 10 bis 50 nm aufweisen.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die Wasser in Mengen von 20 bis 90 Gew.-%, vorzugsweise von 30 bis 80 Gew.-% und insbesondere von 30 bis 60 Gew.-% enthalten.
5. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, welche die Ölphase in Mengen von 10 bis 80 Gew.-%, vorzugsweise 20 bis 70 Gew.-% und insbesondere von 25 bis 55 Gew.-% enthalten.
6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die in der Ölphase Fettsäuremethylester der Formel (I) enthalten,



wobei R^1 für eine Alkylrest mit 6 bis 22 C-Atomen steht und R^2 einen Methylrest bedeutet.

7. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die in der Ölphase Methyloleat, Methylpalmitat, Methylstearat und/oder Methylpelargonat enthalten.
8. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die in der Ölphase Kokos-, Sonnenblumen- und/oder Rapsöl enthalten.
9. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die als Emulgatoren Alkyloligoglycoside enthalten.
10. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die Emulgatoren in Mengen von 10 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise in Mengen von 15 bis 40 Gew.-% und insbesondere in Mengen von 20 bis 35 Gew.-% enthalten.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/04364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N1/00 C12N1/26 C12P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 372 943 A (INLOW DUANE ET AL) 13 December 1994 (1994-12-13) column 3, line 5 - line 23 column 4, line 36 - line 50 column 8, line 21 - line 50 claims 1-13; examples 1-3; table 1 ---	1-8,10
X	US 5 674 830 A (BRENKMAN TANJA ET AL) 7 October 1997 (1997-10-07) column 2, line 10 - line 17 column 3, line 3 - line 18; claims 1-20; examples 1-6 ---	1-7,9,10
A	DE 197 35 790 A (HENKEL KGAA) 25 February 1999 (1999-02-25) page 1, column 26 -column 34 page 3, line 4 - line 7 claims 1-11; tables 1,2 ---	1-10
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 November 2000

Date of mailing of the international search report

09/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/04364

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 409 314 A (ENIRICERCH SPA) 23 January 1991 (1991-01-23) claims 1-17; examples 1-10 ---	1-10
A	US 4 871 665 A (VIEHWEG HOLGER) 3 October 1989 (1989-10-03) column 3, line 38 - line 49 -----	1-10

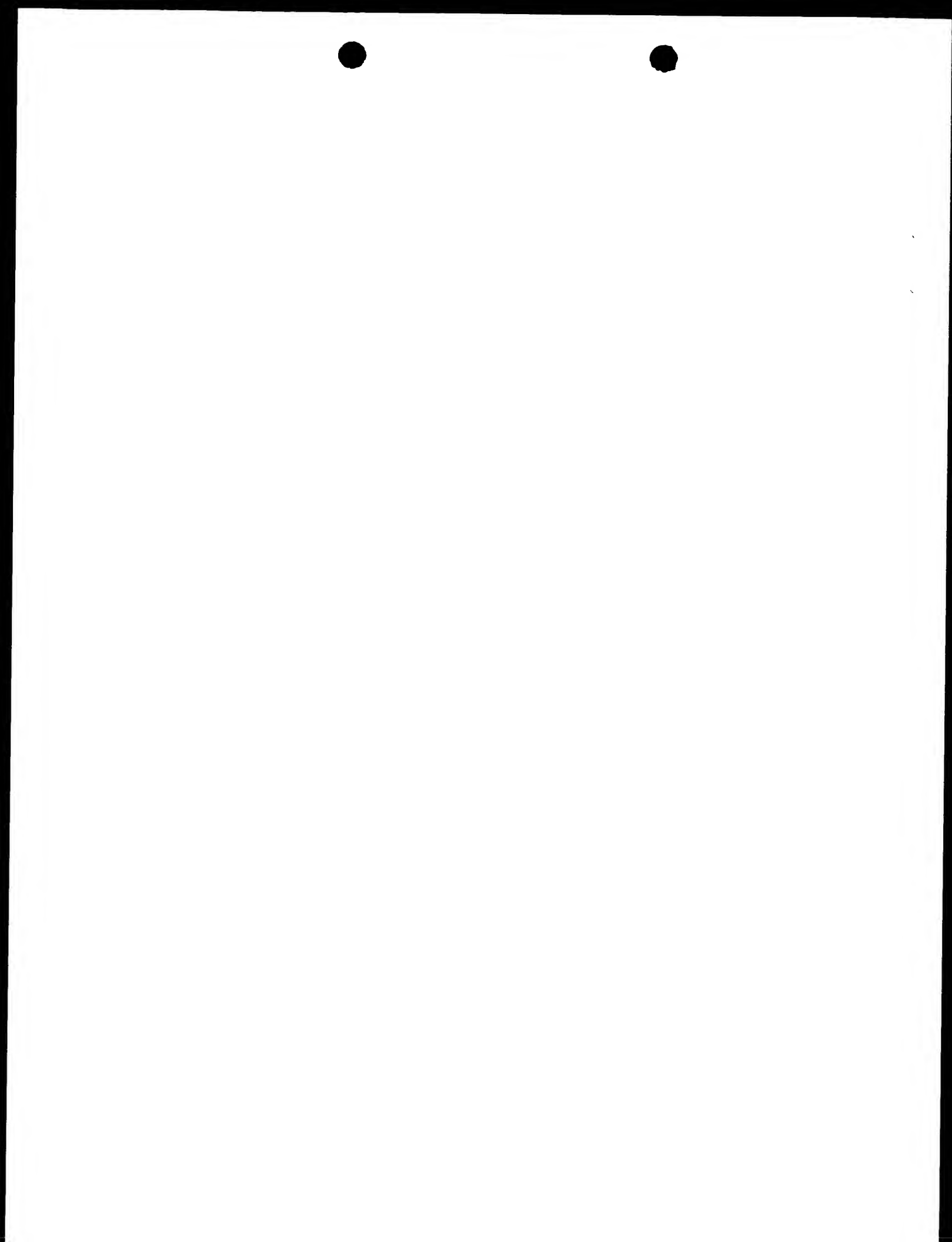
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/04364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5372943 A	13-12-1994	AU 4312489 A WO 9003429 A AT 159287 T AU 2255488 A CA 1315725 A DE 3856043 D DE 3856043 T EP 0377582 A IL 87195 A JP 2504225 T JP 2788270 B WO 8901027 A	18-04-1990 05-04-1990 15-11-1997 01-03-1989 06-04-1993 20-11-1997 16-04-1998 18-07-1990 12-04-1994 06-12-1990 20-08-1998 09-02-1989
US 5674830 A	07-10-1997	AT 150488 T AU 671288 B AU 4560093 A CA 2139308 A DE 69309099 D DE 69309099 T WO 9401575 A EP 0668922 A ES 2100548 T JP 7509126 T ZA 9304881 A	15-04-1997 22-08-1996 31-01-1994 20-01-1994 24-04-1997 10-07-1997 20-01-1994 30-08-1995 16-06-1997 12-10-1995 09-01-1995
DE 19735790 A	25-02-1999	AU 9434898 A WO 9908517 A EP 1005269 A	08-03-1999 25-02-1999 07-06-2000
EP 0409314 A	23-01-1991	CH 680223 A AT 93885 T CA 2021248 A DE 69003044 D DE 69003044 T DK 409314 T ES 2058759 T JP 3088891 A SU 1839631 A US 5196129 A	15-07-1992 15-09-1993 18-01-1991 07-10-1993 20-01-1994 15-11-1993 01-11-1994 15-04-1991 30-12-1993 23-03-1993
US 4871665 A	03-10-1989	DE 3545246 A AT 75259 T DE 3685014 A EP 0229990 A JP 1979330 C JP 7004263 B JP 62163696 A NO 865188 A, B,	25-06-1987 15-05-1992 27-05-1992 29-07-1987 17-10-1995 25-01-1995 20-07-1987 22-06-1987



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04364

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N1/00 C12N1/26 C12P1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EP0-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 372 943 A (INLOW DUANE ET AL) 13. Dezember 1994 (1994-12-13) Spalte 3, Zeile 5 - Zeile 23 Spalte 4, Zeile 36 - Zeile 50 Spalte 8, Zeile 21 - Zeile 50 Ansprüche 1-13; Beispiele 1-3; Tabelle 1 ---	1-8,10
X	US 5 674 830 A (BRENKMAN TANJA ET AL) 7. Oktober 1997 (1997-10-07) Spalte 2, Zeile 10 - Zeile 17 Spalte 3, Zeile 3 - Zeile 18; Ansprüche 1-20; Beispiele 1-6 ---	1-7,9,10
A	DE 197 35 790 A (HENKEL KGAA) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Seite 1, Spalte 26 - Spalte 34 Seite 3, Zeile 4 - Zeile 7 Ansprüche 1-11; Tabellen 1,2 ---	1-10
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04364

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 409 314 A (ENIRICERCH SPA) 23. Januar 1991 (1991-01-23) Ansprüche 1-17; Beispiele 1-10 ---	1-10
A	US 4 871 665 A (VIEHWEG HOLGER) 3. Oktober 1989 (1989-10-03) Spalte 3, Zeile 38 - Zeile 49 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04364

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5372943 A	13-12-1994	AU 4312489 A	18-04-1990
		WO 9003429 A	05-04-1990
		AT 159287 T	15-11-1997
		AU 2255488 A	01-03-1989
		CA 1315725 A	06-04-1993
		DE 3856043 D	20-11-1997
		DE 3856043 T	16-04-1998
		EP 0377582 A	18-07-1990
		IL 87195 A	12-04-1994
		JP 2504225 T	06-12-1990
		JP 2788270 B	20-08-1998
		WO 8901027 A	09-02-1989
US 5674830 A	07-10-1997	AT 150488 T	15-04-1997
		AU 671288 B	22-08-1996
		AU 4560093 A	31-01-1994
		CA 2139308 A	20-01-1994
		DE 69309099 D	24-04-1997
		DE 69309099 T	10-07-1997
		WO 9401575 A	20-01-1994
		EP 0668922 A	30-08-1995
		ES 2100548 T	16-06-1997
		JP 7509126 T	12-10-1995
		ZA 9304881 A	09-01-1995
DE 19735790 A	25-02-1999	AU 9434898 A	08-03-1999
		WO 9908517 A	25-02-1999
		EP 1005269 A	07-06-2000
EP 0409314 A	23-01-1991	CH 680223 A	15-07-1992
		AT 93885 T	15-09-1993
		CA 2021248 A	18-01-1991
		DE 69003044 D	07-10-1993
		DE 69003044 T	20-01-1994
		DK 409314 T	15-11-1993
		ES 2058759 T	01-11-1994
		JP 3088891 A	15-04-1991
		SU 1839631 A	30-12-1993
		US 5196129 A	23-03-1993
US 4871665 A	03-10-1989	DE 3545246 A	25-06-1987
		AT 75259 T	15-05-1992
		DE 3685014 A	27-05-1992
		EP 0229990 A	29-07-1987
		JP 1979330 C	17-10-1995
		JP 7004263 B	25-01-1995
		JP 62163696 A	20-07-1987
		NO 865188 A,B,	22-06-1987

